

異系ラット間肝移植におけるリポソーム包埋クロドロネート投与によるクッパー細胞・マクロファージ消去の移植片生着延長効果

著者	赤松 順寛
号	3181
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/22043

氏 名（本籍）
あか まつ より ひろ
赤 松 順 寛

学 位 の 種 類
博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号
医 第 3 1 8 1 号

学位授与年月日
平 成 11 年 9 月 8 日

学位授与の条件
学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴
平 成 元 年 3 月 20 日
秋田大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目
異系ラット間肝移植におけるリポソーム包埋クロ
ドロネート投与によるクッパー細胞・マクロファージ
消去の移植片生着延長効果

（主 査）
論文審査委員 教授 里 見 進 教授 名 倉 宏

教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

【目 的】

マクロファージ (Mφ) は, MHC class II と costimulatory 分子を通じ, T 細胞に抗原提示し活性化させる。クッパー細胞 (Kc) は, 肝固有 Mφ であり, 肝移植後の免疫反応において, 抗原提示能, 遊走因子や NO 等の放出により, 重要な役割を果たしていると考えられる。近年, リポソーム包埋クロドロネート (LC) 静注による Kc・Mφ の消去・減少法を用いた, 様々な病態研究報告がなされている。我々は, 異系ラット間肝移植において, LC を投与し Kc・Mφ を消去・減少させ, 肝グラフト (LG) 生着延長効果とその免疫寛容誘導について研究した。

【方 法】

ラット肝移植は, DA ラット (RT1^a) をドナー, ルイスラット (RT1^b) をレシピエントとし, Kamada らの方法に準じて行った。LC は, Rooijen らの方法に準じて作成した。

1. 肝移植における Kc・Mφ の消去・減少の効果を検討するため, 無処置群: 無処置ドナーの LG を移植, Kc 消去群: 移植前 2 日前にドナーに LC を静注し, Kc を消去した LG を移植, 追加投与群: Kc 消去 LG を移植し, 3, 6 病日にレシピエントに LC を静注, 術後投与群: 無処置 LG を移植し, 3, 6 病日に LC を静注, 術後頻回投与群: 無処置 LG を移植し, 0 から 6 病日に LC を静注, の 5 群を作成し, その生存期間を観察した。

2. 各実験群の解析のため, 無処置群, Kc 消去群, 追加投与群における, (1) 肝機能検査, (2) 病理学的所見 (HE 染色), (3) 免疫組織化学二重染色による LG 浸潤 Mφ の検討を行った。抗体は, 末梢単球・Mφ に対する ED1 と Kc などの臓器固有 Mφ に対する ED2 を用いた。

3. 肝移植と同じ系の組み合わせのラット心移植において, 追加投与群の長期生存例より採取した血清をレシピエントに 0, 2 病日に投与し, adoptive serum transfer の実験を行った。

4. 追加投与群の長期生存例に対し, DA ラットの皮膚移植実験を行った。

【結 果】

1. 生存期間

追加投与群では, 150 日以上 of 長期生存例が 5 例中 3 例認められ, 無処置群, Kc 消去群に対して有意に延長した。術後投与群, 術後頻回投与群では, 無処置, Kc 消去群より長く, 追加投与群より短かったが, いずれの群とも有意差を認めなかった。

2. 各実験群の解析

- (1) 血清ビリルビン値は、無処置群、Kc 消去群では徐々に上昇し、9 病日に最高値を示した。追加投与群においては、術後 12 日に最高値 (14.4mg/dl) に急上昇した後漸減した。
- (2) 病理学的所見：無処置群では、経時的に単核球浸潤がグリソン鞘 (GS) から肝細胞領域 (HP) に広がり組織破壊をもたらした。Kc 消去群における単核球浸潤は、3 病日には GS 周囲の軽微なものだが、6 病日以降には HP に広がり、次第に増加した。追加投与群では、12 病日までに、単核球細胞の浸潤が GS 周囲から HP に広がり、肝細胞の破壊像も認められた。しかし、15 病日以降次第に浸潤細胞が減少し、30 病日には GS 周囲に浮腫と著明な線維化を認めた。
- (3) 免疫染色所見：無処置群の 3 病日において、GS 周囲に ED1 陽性円形細胞、HP には ED2 陽性の不正な形態を持つ Kc が認められた。6 病日以降になると、両陽性円形細胞が多数出現した。Kc 消去群では、3 病日において、ED1 陽性円形細胞が GS、HP に散見され、Kc は認められなかった。6 病日以降は、両陽性円形細胞が数を増した。追加投与群では、6 病日に於いて、両陽性円形細胞の浸潤が Kc 消去群に比べて軽度であった。12 病日には、GS 周囲、HP への著明な浸潤が認められるが、15 病日以降減少した。

3. adoptive serum transfer 実験

対照群に比し、平均一日延長した。

4. 皮膚移植実験

皮膚移植後レシピエントが死亡するまで、皮膚移植片は生着した。

【結 論】

本実験の結果、移植前に Kc を消去するだけでは LG は拒絶され、移植後にも Mφ を減少させる事により長期生存が得られた。このことから、肝移植後拒絶反応抑制のためには、抗原提示の direct pathway, indirect pathway 双方を阻害することの重要性が示された。病理所見及び免疫染色所見より、両陽性円形細胞が拒絶反応・組織破壊に大きな役割を果たし、その消退により拒絶反応が沈静化した。長期生存例の LG は著明な線維化をきたしていたが、adoptive transfer の実験で心グラフトが早期に拒絶されないことや皮膚移植片が生着したことから、液性免疫以外の機序が働いていると推察され、その詳細なメカニズムの解明は今後の検討課題と考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

クッパー細胞は、肝固有のマクロファージであり、その貪食能、抗原提示能及び各種メディエーター放出能により、肝移植後拒絶反応において重要な役割を果たしていると考えられている。また、移植後はドナー由来からレシピエント由来のクッパー細胞に置き換わるなど、その免疫反応に及ぼす影響は興味深い。マクロファージ系細胞は、異系間移植において、アロ抗原をそのMHC class II上に提示し、Costimulatory 分子と共にTリンパ球に抗原提示し、免疫反応の起点となる働きを持つ。本研究では、異系ラット間肝移植モデルを用いて、クッパー細胞並びにマクロファージを肝移植前後にわたり、リボソーム包埋クロドロネート投与により消去減少させ、拒絶反応抑制効果、つまり移植後生存期間延長効果の有無及びその免疫学的背景について検討している。

まず、リボソーム包埋クロドロネートを、移植前にドナーにのみ投与し肝グラフト内のクッパー細胞を消去した群、クッパー細胞を消去した肝グラフトを移植し移植後レシピエントにも追加投与した群、移植後レシピエントにのみ投与した群を作成し、その生存期間を検討している。

その結果、追加投与群において生存期間の延長が認められたことより、移植前後にわたり、マクロファージ系細胞を消去減少させ、ドナー由来・レシピエント由来双方の抗原提示細胞機能を阻害することが、肝移植後拒絶反応の抑制に重要であることが示された。

次に、各群における生化学的、病理学的及び免疫組織化学的検討を行い、追加投与群において、(1)血清ビリルビンは、移植後初期に低値を推移した後急上昇するが2週間目以降漸減する、(2)単核球浸潤が時期は遅れるものの次第に増加した後に漸減し、グリソン鞘周囲に線維化と浮腫が残存する、(3)移植された肝グラフト内の単球・マクロファージ浸潤の増加・減少が拒絶反応の増悪・軽減に伴い認められたことを示している。

更に、追加投与群の長期生存例の血清を用いて、adoptive serum transferの実験を行い、その血清中に免疫反応抑制・促進物質のない事を明らかにし、また、長期生存例に対する皮膚移植実験を行い、肝移植と同系ドナーの皮膚が生着したことから、長期生存例は肝組織は繊維化が進行しているにもかかわらず、アロ抗原に対する免疫寛容状態にあることを示した。

以上の結果は、追加投与群における生存期間の延長は、拒絶反応の完全な抑制ではなく、拒絶反応出現後に免疫寛容が誘導された結果であり、肝線維化の機序は慢性拒絶反応以外の病態が関与していることを示唆している。また、異系ラット間肝移植後拒絶反応では、レシピエント由来の活性化された単球・マクロファージが組織破壊に重要な役割を果たしていることを示唆している。

現在、臨床において用いられる免疫抑制剤は、主にリンパ球に対する免疫抑制であり、本研究で得られた“薬剤によるマクロファージ系細胞の制御が免疫寛容を誘導する”という結果は、臓器移植後免疫抑制療法の新しい可能性を示したものである。従って、本研究は十分に学位に値する。